

BAB III

METODE PENELITIAN

3.1. Tempat dan Waktu Pelaksanaan

Tempat pelaksanaan penelitian di Laboratorium Kultur Mitra Anggrek Indonesia (MAI) Jl. Hasanudin Gg. 1 No. 9A Dusun Jeding, Kecamatan Junrejo, Kota Batu. Prapenelitian dilaksanakan pada tanggal 9 Januari 2018 sampai tanggal 14 Mei 2018. Penelitian dimulai pada tanggal 16 Mei 2018 sampai tanggal 27 Juni 2018.

3.2. Alat dan Bahan

3.2.1. Alat

Alat yang digunakan dalam penelitian ini adalah Laminar Air Flow (LAF), *air conditioner* (AC), autoklaf, timbangan analitik, magnetic stirrer, labu semprot, cawan petri, botol kultur, gelas stainless, gelas piala, gelas ukur, pembakar bunsen, scalpel and blade, pinset, kompor gas, panci, pH indikator, hand sprayer, pipet, mikropipet, rak kultur, plastik, *plastic wrap*, karet, kertas saring, kertas label, mistar/penggaris, dan alat dokumentasi (kamera).

3.2.2. Bahan

Bahan yang digunakan dalam penelitian ini adalah planlet apel varietas Manalagi, komposisi media dasar Murashige dan Skoog (1962), GA₃ (giberelin), IAA (auksin), pematik media agar, alkohol 90% dan 70%, air steril, dan spirtus.

3.3. Metode Penelitian

Pelaksanaan penelitian ini menggunakan Rancangan Acak Lengkap (RAL). Perlakuan yang diberikan merupakan kombinasi konsentrasi GA₃ dan IAA sebanyak tujuh perlakuan, yaitu:

R1 = 1 ppm GA₃ + 7 ppm IAA

R2 = 2 ppm GA₃ + 6 ppm IAA

R3 = 3 ppm GA₃ + 5 ppm IAA

R4 = 4 ppm GA₃ + 4 ppm IAA

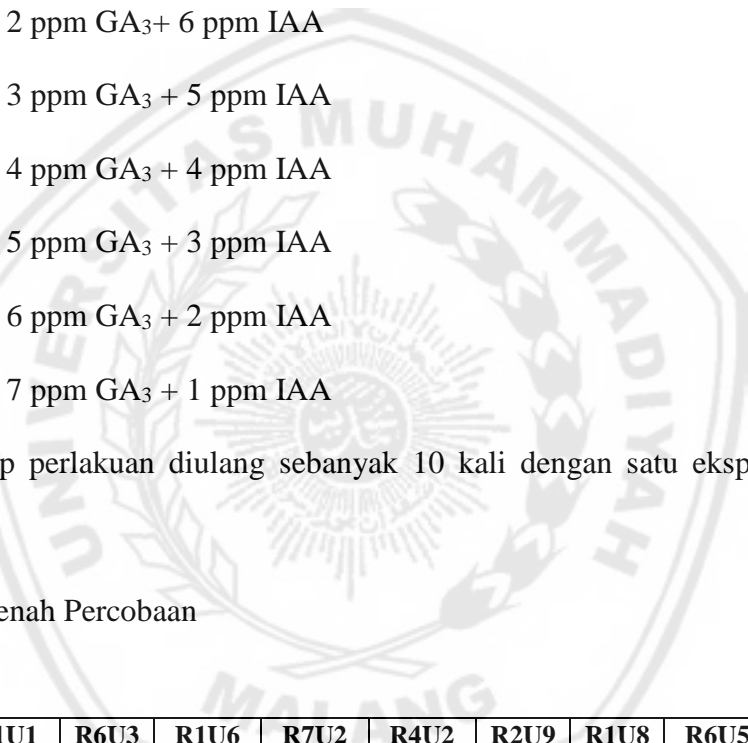
R5 = 5 ppm GA₃ + 3 ppm IAA


R6 = 6 ppm GA₃ + 2 ppm IAA

R7 = 7 ppm GA₃ + 1 ppm IAA

Setiap perlakuan diulang sebanyak 10 kali dengan satu eksplan di setiap ulangan.

Tabel 1. Denah Percobaan





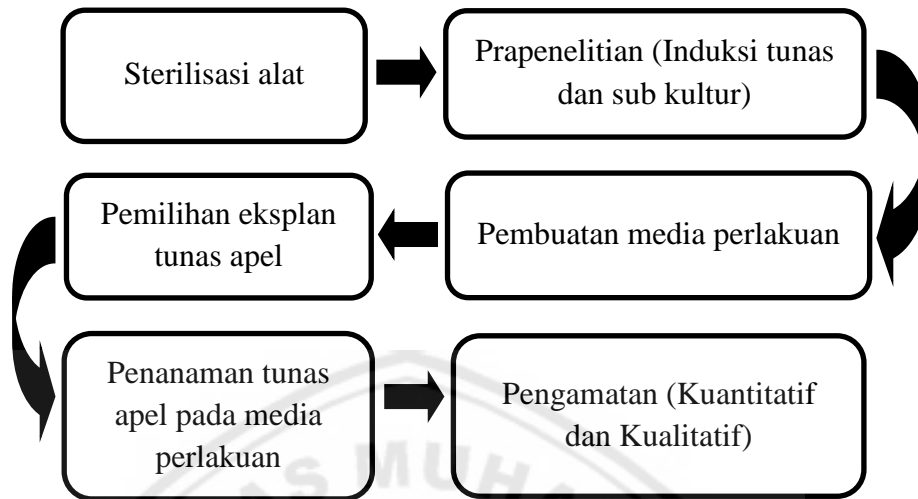
R3U1	R1U1	R6U3	R1U6	R7U2	R4U2	R2U9	R1U8	R6U5	R4U1
R5U9	R6U8	R2U5	R7U7	R4U8	R3U3	R5U5	R7U8	R5U4	R7U1
R7U5	R5U10	R1U9	R6U9	R3U10	R4U9	R1U4	R3U7	R4U3	R1U10
R2U8	R3U4	R5U8	R3U2	R1U3	R7U10	R2U3	R6U1	R6U10	R2U7
R4U10	R6U2	R2U1	R4U5	R4U4	R3U5	R7U9	R4U6	R5U6	R6U6
R1U2	R5U1	R3U9	R2U10	R7U6	R1U7	R6U7	R7U4	R3U8	R1U5
R6U4	R7U3	R5U2	R2U6	R5U7	R2U4	R3U6	R5U3	R4U7	R2U2

Keterangan: R₍₁₋₇₎ = menyatakan perbedaan perlakuan yang diujikan, yaitu sebagai berikut:

R1 = Penambahan 1 ppm GA₃ + 7 ppm IAA; R2 = Penambahan 2 ppm GA₃ + 6 ppm IAA; R3 = Penambahan 3 ppm GA₃ + 5 ppm IAA; R4 = Penambahan 4 ppm GA₃ + 4 ppm IAA; R5 = Penambahan 5 ppm GA₃ + 3 ppm IAA; R6 = Penambahan 6 ppm GA₃ + 2 ppm IAA; R7 = Penambahan 7 ppm GA₃ + 1 ppm IAA.

U₍₁₋₁₀₎ = menyatakan ulangan 1 sampai ulangan 10

3.4. Pelaksanaan Penelitian



Gambar 2. Diagram Alur Penelitian

3.4.1. Sterilisasi Alat

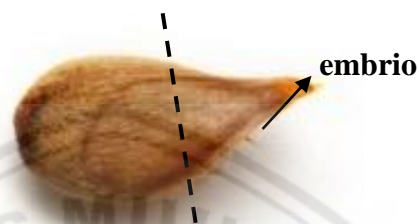
Alat-alat yang digunakan seperti botol dan cawan petri dibersihkan bagian dalam dan bagian luarnya terlebih dahulu dengan sabun cuci, diletakkan pada krat, kemudian ditunggu hingga kering. Selanjutnya botol yang telah dikeringkan dimasukkan ke dalam autoklaf. Cawan petri kemudian dibungkus dengan kertas dan disterilkan di dalam autoklaf dengan suhu 121°C tekanan 17,5 psi selama 15 menit. Alat yang telah disterilkan dimasukkan dalam ruangan steril (Hidayatulloh, 2017).

3.4.2. Prapenelitian

A. Induksi Tunas

Biji yang digunakan merupakan biji apel varietas Manalagi yang dipotong bagian embrionya dan ditanam pada media induksi tunas. Media untuk induksi tunas adalah media E1 (MS+2,5 ppm TDZ+0,5 ppm IBA),

E1B (MS+0,5 ppm TDZ+0,2 ppm IBA), E2 (MS+3 ppm TDZ+0,5 ppm IBA), dan E3 (MS+3,5 ppm TDZ+0,5 ppm IBA). Fungsi induksi tunas adalah untuk menumbuhkan tunas dari embrio biji apel. Berikut merupakan bagian embrio biji apel yang digunakan untuk induksi tunas (Gambar 4).



Gambar 3. Biji Buah Apel Manalagi
Sumber: (Herbal, 2018)

Tahapan proses induksi tunas adalah sebagai berikut:

1. Mencuci buah apel Manalagi menggunakan sabun *antibacterial* hingga bersih.
2. Memotong buah apel dengan membuang bagian daging buahnya dan mengambil sisi tengah buah yang terdapat biji di dalamnya.
3. Memasukkan bagian tengah buah apel ke dalam larutan kloroks 10% selama 20 menit dan larutan kloroks 5% selama 10 menit.
4. Mencuci bagian tengah buah ke dalam air steril sebanyak 3 kali.
5. Mengeluarkan bagian tengah buah apel dari botol air steril ke atas cawan petri yang sudah diberi alas kertas saring steril.
6. Mengeluarkan biji apel dari bagian tengah buah apel.
7. Memotong biji apel Manalagi dan diambil bagian embrio bijinya (Gambar 4) menggunakan *scalpel and blade*.
8. Menanam embrio biji pada media induksi tunas.

B. Subkultur Tunas

Penanaman subkultur tunas apel di dalam media MS melalui dua kali tahapan subkultur sebagai berikut.

1. Subkultur Tunas Pertama

Eksplan yang disubkultur untuk yang pertama setelah dilakukan induksi adalah eksplan yang berumur 1 bulan. Subkultur tunas pertama ini menggunakan media MS tanpa zat pengatur tumbuh. Tujuan dari subkultur yang pertama ini yaitu untuk memperbanyak tunas eksplan sebagai bahan tanam, menghindarkan eksplan dari kekurangan nutrisi karena media yang telah lama dipakai, menetralkan konsentrasi zat kimia pada eksplan dari berbagai media yang berbeda ke media yang sama. Tahapan subkultur adalah sebagai berikut:

- 1) Eksplan tunas apel yang disubkultur disiapkan sebagai bahan tanam dalam penelitian.
- 2) Alat dan bahan disemprot menggunakan alkohol 70%, lalu dimasukkan dalam *laminar air flow* (LAF).
- 3) LAF ditutup dan menyalakan sinar UV selama 60 menit.
- 4) Mematikan lampu UV kemudian menyalakan *blower*, selanjutnya lampu neon dinyalakan dan LAF siap digunakan.
- 5) Mengambil bahan subkultur tunas apel yang tersedia dalam botol.
- 6) Menyemprot botol bahan subkultur dan media dengan alkohol 70%, memasukkan kedalam LAF.

- 7) Mensterilkan *scalpel and blade* dan pinset dengan dicelupkan kedalam alcohol 90% lalu membakar dengan bunsen, cawan petri juga dipanaskan dengan bunsen, di wadah cawan petri diberi kertas saring.
- 8) Membuka bahan subkultur tunas, lalu meletakkannya di atas kertas saring pada cawan petri. Tujuannya agar air atau sisa media yang menempel pada bahan tanam dapat terserap pada kertas saring.
- 9) Memotong bagian yang berwarna coklat atau kuning dan memotong bagian bawah tunas secara perlahan.
- 10) Membuka penutup botol media, selanjutnya memanaskan bibir botol pada bunsen, kemudian menanam tunas apel pada media dengan keadaan dekat dengan bunsen.
- 11) Bibir botol dipanaskan kembali dengan bunsen, menutup kembali dan memberi label sesuai dengan perlakuan.
- 12) Melapisi plastik untuk tutup botol kultur dengan *plastic wrap* agar tutup lebih rapat dan menghindari kontaminasi.
- 13) Botol disimpan ke dalam rak penyimpanan dengan penerangan lampu neon 20 watt serta mengatur suhu pada *temperature* 18°C.

2. Subkultur Tunas Kedua

Subkultur tunas kedua dilakukan setelah eksplan berusia dua bulan atau satu bulan setelah dilakukan subkultur pertama. Tujuan dari subkultur yang kedua adalah mengisolasi eksplan agar lebih siap ditanam pada media perlakuan serta menghilangkan pengaruh eksplan dari media perlakuan ZPT sebelumnya. Tahapan pada subkultur kedua sama dengan subkultur yang

pertama. Media yang digunakan pada subkultur yang kedua juga sama yaitu MS tanpa penambahan zat pengatur tumbuh.

3.4.3. Penelitian

A. Pembuatan Media Perlakuan

Cara pembuatan media yaitu pertama menyiapkan semua bahan yang digunakan untuk pembuatan media perlakuan. Selanjutnya menimbang bahan yang digunakan dalam pembuatan media yang terdiri dari unsur hara makro, mikro, vitamin, dan zat pengatur tumbuh. Membuat larutan stok, kemudian memasukkan larutan ke dalam botol stok dengan konsentrasi 100 ppm. Pengambilan larutan stok sesuai dengan kebutuhan media yang dibuat. Jika membuat media untuk 1 liter atau 1000 ml, maka mengambil masing-masing larutan stok 10 ml, lalu memasukkan ke dalam wadah. Setelah semua komposisi larutan stok masuk, kemudian menambahkan zat pengatur tumbuh giberelin (GA_3) dan auksin IAA sesuai perlakuan, perhitungan larutan stok GA_3 dilihat pada (lampiran 7). Selanjutnya menambahkan sukrosa sebanyak 30 g, menambahkan dengan air aquadest steril hingga 1000 ml. Mengukur pH menggunakan pH indikator hingga mencapai 5,8. Memasukkan larutan ke dalam panci, kemudian ditambahkan dengan agar murni sebanyak 8,5 g, memasaknya sambil diaduk hingga mendidih. Memasukkan media ke dalam botol kultur serta menutupnya menggunakan plastik tahan panas dan karet secara rapat dan memberi label nama pada botol. Selanjutnya memasukkan botol ke dalam autoklaf untuk disterilkan medianya, selama 15 menit dengan tekanan 17,5 psi.

B. Pemilihan dan Penanaman Eksplan

Eksplan yang ditanam (gambar 1) di media perlakuan adalah eksplan berumur lebih dari dua bulan dan disubkultur sebanyak dua kali. Eksplan bertunas majemuk (bergerombol) yang diinduksi dari embrio biji apel. Eksplan dipotong bagian batang bawahnya kemudian di tanam pada media perlakuan.



Gambar 4. Eksplan tunas apel varietas Manalagi
Sumber: dokumentasi pribadi

3.5. Variabel Pengamatan

Variabel pengamatan penelitian ini dibagi menjadi dua, yaitu pengamatan secara kuantitatif dan kualitatif. Pengamatan dilakukan setiap seminggu sekali selama 6 minggu setelah tanam (mst) untuk mengetahui pengaruh perlakuan terhadap pertumbuhan tunas dan perakaran apel. Variabel pengamatan kuantitatif yaitu berupa:

1. Jumlah Tunas

Dilakukan pengamatan secara visual dengan menghitung jumlah tunas pada eksplan tanaman. Tunas yang dihitung merupakan tunas yang menonjol berwarna putih kehijauan. Variabel ini diamati pada akhir pengamatan yaitu minggu ke-6 setelah tanam.

2. Panjang Tunas (cm)

Panjang eksplan diamati dan diukur pada akhir pengamatan (6 minggu setelah tanam). Variabel ini diamati dengan cara mengukur tinggi tunas dari batas media sampai titik tumbuh tunas paling tinggi dari eksplan dengan menggunakan penggaris/ mistar.

3. Jumlah Cabang Tunas

Cabang tunas merupakan yang muncul pada setiap ketiak daun. Dihitung secara visualisasi pada akhir pengamatan yaitu 6 minggu setelah tanam.

4. Jumlah Daun

Jumlah daun dihitung dalam satu eksplan tanaman yang mekar sempurna. Jumlah daun diamati setiap minggu selama 6 minggu.

5. Jumlah Akar

Jumlah akar dihitung merupakan akar (radikula) yang muncul secara visual. Dihitung jika akar mempunyai Panjang 1 cm atau lebih. Jumlah akar dihitung pada pengamatan terakhir (6 minggu setelah tanam).

6. Panjang Akar (cm)

Panjang akar diukur pada akar terpanjang yang muncul setelah panjangnya mencapai 1 cm atau lebih pada eksplan tunas saat pengamatan terakhir (6 minggu setelah tanam). Pengukuran menggunakan penggaris/mistar.

Variabel pengamatan kualitatif yaitu berupa:

1. Kenampakan Pertumbuhan Tunas dan Akar

Variabel ini merupakan variabel pengamatan kualitatif dengan cara mengamati pertumbuhan pada tunas apel dari pengamatan pertama (0 MST) sampai akhir pengamatan (6 MST).

2. Perubahan Warna dan Bentuk Tunas

Variabel ini merupakan variabel pengamatan kualitatif. Perubahan warna yang terjadi pada daun dan batang tunas yang mengalami pertumbuhan. Perubahan warna tunas diamati menggunakan kertas warna munsell. Perubahan bentuk yang nampak pada eksplan tunas yang mengalami pertumbuhan setiap minggunya.

3.6. Analisis dan Penyajian Data

Data kuantitatif yang diperoleh dianalisis dengan uji statistik analisis varians (ANOVA), untuk mengetahui ada tidaknya pengaruh dari perlakuan. Apabila ada perbedaan, pengujian dilanjutkan dengan uji BNJ pada taraf 5%. Penyajian data menggunakan tabel atau grafik. Sedangkan data pengamatan kualitatif disajikan dalam bentuk dokumentasi hasil pengamatan dan dilakukan study literatur.